



(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 00221357 B1

(43)Date of publication of application: 28.06.1999

(21)Application number: 960067998

(22)Date of filing: 19.12.1996

(71)Applicant: DOOSAN CORPORATION

(72)Inventor: BAEK, UN HWA  
CHOI, U SEOK  
HONG, SEONG YONG  
PARK, JANG SEO

(51)Int. Cl. C12P 19/00

(54) PREPARATION METHOD OF SPHINGOLIPID WITH HIGH YIELD THROUGH OPTIMIZATION OF FERMENTATION USING NEW STRAIN OF YEAST PICHIA CIFERRII DSCC 7-25

(57) Abstract:

PURPOSE: A production method of sphingolipid using *Pichia ciferrii* DSCC 7-25 is provided, which increases the productivity two times compared with known methods. Sphingolipid is isolated from animal tissues or plant but its yield is very low. Sphingosine, phytosphingosine, and derivatives thereof produced from *Pichia* are expensive and can be used as a precursor of synthesis of ceramide or their derivatives.

CONSTITUTION: *Pichia ciferrii* DSCC 7-25 is isolated from spore of *Pichia ciferrii* (ATCC 14091) and the maximum cell mass is obtained from culturing for 3 days. The production yield of tetraacetylphytosphingosine (TAPS) is high and the culture condition and a medium composition are optimized for the maximum production of TAPS. Non fermentable carbon source, glycerol, is selected as a carbon source for medium to maximize productivity of sphingolipid. The aeration speed is critically related to production rate and optimal growth temperature is 25 deg.C. The main culture medium consists of 5-15mM of calcium chloride, 0.4-0.7% of serine, 0.2-0.4% of yeast extract, 0.2-0.4% of malt extract, 0.3-0.7% of peptone, and 2.5-3.5% of glycerol. The stirring speed is 400-600rpm and the temperature is sustained at 22-28 deg.C. The maximum concentration of TAPS in the medium is kept at 5-7g/L.

COPYRIGHT 2001 KIPO

## Legal Status

Date of request for an examination (19961219)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (19990330)

Patent registration number (1002213570000)

Date of registration (19990628)

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(51) Int. Cl. C12P 19/00		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	1999년10월01일 10-0221357 1999년06월28일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 (73) 특허권자	10-1996-0067998 1996년12월19일 주식회사두산, 유병택 대한민국 150-031 서울특별시 영등포구 문래동 6가 13	(65) 공개번호 (43) 공개일자	특1998-0049306 1998년09월15일
(72) 발명자	백운화 대한민국 서울특별시 서대문구 연희 3동 48-2 박장서 대한민국 경기도 과천시 별양동 주공APT 710동 401호 홍성용 대한민국 서울특별시 강남구 압구정동 한양APT 51동 406호 최우석 대한민국 경기도 군포시 산본 2동 럭키백합APT 1126동 603호		
(74) 대리인	김동완		
(77) 심사청구	심사관: 이처영		
(54) 출원명	신규 효모균주 피키아 시페라이 DSCC 7-25의 발효 최적화를 통한 고효율 스팅고리피드의 제조방법		

#### 요약

본 발명은 새로 분리된 스팅고리피드 우수 생산균주인 효모 피키아 시페라이 DSCC 7-25의 발효조건 및 스팅고리피드 분리정제 방법의 최적화를 통해 스팅고리피드, 구체적으로 세라마이드 혹은 세라마이드 유도체 합성의 핵심 전구물질인 스팅고신, 파이토스팡고신 등의 스팅고리피드 긴사슬염기를 고순도로 효과적이고 경제적으로 대량생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세히는 YMgl 배지에 5~15mM의 CaCl<sub>2</sub> 및 세린 4~7g/L를 첨가한 배지에 피키아 시페라이 DSCC 7-25(KFCC-10937)를 접종 발효시켜 회분식 배양항을 특징으로 하는 고효율 테트라아세탈파이토스팡고신(TAPS)의 제조방법에 관한 것이다.

#### 명세서

##### 발명의 상세한 설명

##### 발명의 목적

##### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 새로 분리된 스팅고리피드 우수 생산균주인 효모 피키아 시페라이 DSCC 7-25의 발효조건 및 스팅고리피드 분리정제 방법의 최적화를 통해 스팅고리피드, 구체적으로 세라마이드 혹은 세라마이드 유도체 합성의 핵심 전구물질인 스팅고신, 파이토스팡고신 등의 스팅고리피드 긴사슬염기를 고순도로 효과적이고 경제적으로 대량생산하는 방법에 관한 것이다.

스팡고리피드로 통칭되는 세라마이드 혹은 세라마이드 유도체들은 동물, 식물, 효모등 고등세포의 막구조를 형성하는 주요 지질로서 단순히 구조적인 기능 이외에 최근에는 세포의 분화, 신호전달체계의 중간전달물질로서의 역할 등의 생리활성기능이 밝혀지면서 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 사람의 피부조직에서의 스팅고리피드 기능이 밝혀지면서 화장품의 기능성 조성물로서 다양한 형태의 천연 혹은 합성 스팅고리피드가 사용되기 시작했다. 일반적으로 스팅고리피드는 피부의 표층(Stratum corneum)에 존재하며 수분발산을 억제함으로써 피부건조를 방지하는 효과가 있다.

지금까지는 스팅고리피드를 대부분 동물의 조직이나 혹은 일부 식물체로부터 추출하여 왔으나 분리정제에 많은 노력과 비용이 드는 단점이 있다. 더구나 동물조직, 특히 소의 조직에서 추출하는 경우는 광우병인자로 알려져 있는 보바인 스폰지형 엔세팔로마이엘리티스(bovine spongiform encephalomyelitis : BSE)의 감염에 대한 우려가 높아지면서 동물성 스팅고리피드는 화장품 조성물로서 적절치 않은 것으로 인식되고 있다. 한편 천연물에서 추출된 스팅고리피드는 여러 유도체들의 혼합물로서 그 용도가 한정되어 있다. 따라서 고순도이며 특정한 스팅고리피드 제조의 필요성이 증대되고 있다.

미생물, 특히 효모의 스팅고리피드는 동물이나 식물과는 달리 그 종류가 단순하므로 새로운 스팅고리피드의 원천으로서 유망하다. 현재까지 보고된 바로는 여러종류의 효모 및 곰팡이들이 스팅고리피드를 생산하는 것으로 알려졌다. 이 가운데 효모 피키아 시페라이(Pichia ciferrii)는 파이토스핑고신의 아세틸화된 유도체인 테트라아세틸파이토스핑고신(tetraacetylphytosphingosine : TAPS)을 주로하고 일부 이의 유도체들을 세포 밖으로 분비하는 것이 독특한 장점이다. 세포 밖으로 분비되는 TAPS 또는 기타의 스팅고리피드는 분리정제를 간편하게 하므로서 생산성을 높이는 주요인이 될 수 있다. 피키아 시페라이의 발효로 생산된 TAPS 또는 이의 유도체들은 아세틸기를 제거하는 간단한 과정을 거쳐 파이토스핑고신 또는 스팅고신으로 전환될 수 있다. 여기에 특정한 지방산을 통상적인 N-아실레이션 과정을 통해 아마이드 결합을 사키면 세라마이드를 합성하게 된다. 효모 피키아 시페라이는 비병원성이며 생성하는 파이토스핑고신은 화학적 구조가 D-D-에리트로 이성체로서 사람의 피부조직에서 발견되는 스팅고신 긴사슬염기와 동일한 것으로 밝혀졌다.

일반적으로 스팅고신 혹은 파이토스핑고신의 생합성 과정은 세린과 팔미토일-CoA의 중합반응으로 시작되며, 이 첫 번째 단계에서 전체 생합성 과정이 제어되는 것으로 알려졌다. 실제로 피키아 시페라이 균주 중에서 TAPS 생성이 많은 것과 적은 균주를 생화학적으로 분석했을 때, 이 첫 번째 단계를 촉매하는 효소인 세린-팔미토일트랜스퍼라제(serine-palmitoyl transferase)(혹은 3-케토 디하이드로 스팅고신 신페타제, EC2.3.1.50)의 활성차이가 5~10 배에 이르는 것이 보고되었다(Barenholz et al., 1971 & 1973). 최근 효모 사카로마이세스 세레비시예(Saccharomyces cerevisias)를 모델로한 일련의 연구에서 세린-팔미토일트랜스퍼라제 유전자인 LCB1과 LCB2가 분리되었으며(Buede et al., 1991. Nagiec et al., 1994), 스팅고신 대사과정에 영향을 주는 인자들이 밝혀지고 있다(Zhao et al., 1994). 스팅고리피드의 생합성은 생체내의 필수과정이므로 사람으로부터 효모에 이르기까지 진화적으로 보존되어 있을 것으로 생각된다. 따라서 효모 사카로마이세스세레비시예에서 밝혀진 스팅고신 대사조절인자들에 대한 지식이 피키아 시페라이에도 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

효모 피키아 시페라이를 이용하여 고순도의 특정한 스팅고리피드를 경제적으로 대량생산하고자 하는 노력이 최근에 많이 이루어지고 있다. WO 94/10131호에 의하면 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)의 유가식 발효로 최대 2700mg/L TAPS 생산을 기록하였으며, 생산성은 22.5 mg/L/h으로 보고하고 있는데 발효시간을 120시간으로 추정된다. 보다 높은 생산성 향상을 위해 돌연변이 유발 등의 균주개량이 시도될 수 있다. WO 95/12683호(PCT/EP94/03652)에 의하면 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)를 돌연변이시켜 TAPS 생산성이 모균주에 비해 40~60% 증가된 변이주 선별을 주장했다. 한편 EP 94201825호(EP 0 688 871 A2)는 동일한 효모인 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)를 돌연변이시켜 선별된 변이주 가운데 회분식 발효로 최소 500mg/L 최대 1000mg/L를 생산하는 것을 선별하였으며, 이들을 유가식으로 발효시켰을 때 최대 5000mg/L의 TAPS 생산을 기록하였다고 주장하고 있다. 그러나 생산성 측면에서 보면 모균주인 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)의 배양일수가 7일이므로 생산성은 30~42 mg/L/h에 불과한 것으로 추측된다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

발효에 의한 유용물질의 생산에 있어 무엇보다도 중요한 지표는 생산성이다. 본 발명은 효모 피키아 시페라이를 이용한 스팅고리피드, 구체적으로 TAPS, 더 나아가 일반적인 세라마이드의 산업적 생산성을 지금까지 보고되고 있는 어느 것보다 최소 2배 이상 향상시키는 방법을 제공하고 있다.

#### 발명의 구성 및 작용

본 발명은 스팅고리피드, 구체적으로 세라마이드 혹은 세라마이드 유도체 합성의 핵심 전구물질은 스팅고신, 파이토스핑고신 등의 스팅고리피드 긴사슬염기를 고순도로 효과적이고 경제적으로 대량생산하는 방법을 제공한다. 새로 분리된 스팅고리피드 우수 생산균주인 효모 피키아 시페라이 DSCC 7-25의 발효조건 및 스팅고리피드 분리정제 방법의 최적화를 통해 생산성을 기존에 발표된 것보다 최소 2배 이상 향상시켰다. 이렇게 경제적이면서 고순도로 생산된 스팅고신, 파이토스핑고신 혹은 이들의 유도체들은 그 자체가 고가의 물질이면서 동시에 보다 유용한 스팅고리피드 유도체, 특히 세라마이드 및 그의 유도체 합성의 전구물질로서 사용될 수 있다.

따라서 본 발명은 YMG1 배지에 5~15mM의 CaCl<sub>2</sub> 및 세린 4~7g/L를 첨가한 배지에 피키아 시페라이 DSCC 7-25(KFCC-10937)를 접종 발효시켜 회분식 배양함을 특징으로 하는 고효율 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 제조방법에 관한 것으로, 발효시 교반속도 400~600rpm에서 22~28°C에서 발효 배양하고 TAPS의 최대 배양액상 농도가 5~7g/L 되도록 배양시킴을 특징으로 하며, 이때 YMG1 배지의 조성은 효모 추출물 0.2~0.4%, 맥아추출물 0.2~0.4%, 펩톤 0.3~0.7%, 글리세롤 2.5~3.5%가 함유된 수용액 배지이다.

배양된 균체 및 발효 생성물인 스팅고리피드를 3~6°C에서 2~3일간 정치시켜 침전된 균체를 분리 회수한 후, 유기용매로 추출하고 추출된 지질성분을 감압증류 고형화 시킨후, 유기용매에 녹여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 TAPS를 정제함을 특징으로 한다. 또한 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 테트라아세틸 파이토스핑고신(TAPS)를 디아세틸화 반응시켜 얻어진 스팅고신 또는 파이토스핑고신을 지방산과 N-아실화 반응시켜 합성된 세라마이드 유도체를 제공한다.

본 발명과 동시에 출원하는 특허에서 기술한 바와 같이 효모 피키아 시페라이 ATCC-14091호의 포자에서 분리된 피키아 시페라이 DSCC 7-25는 배양 3일만에 최대 균체량에 도달하는 TAPS의 생산성이 높은 새로운 효모이다. 본 발명의 신규한 효모균주 피키아 시페라이 DSCC 7-25는 1996년 11월 27일 한국중균협회내의 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC-10937호로 기탁하였다. 단위 균체 무게에서 생산되는 스팅고리피드, 좀더 구체적으로 TAPS 양을 증가시키기 위해 배지조성, 발효조건 교반속도, 배양온도, 통기조건(aeration)등의 발효 최적화 조건을 탐색하였다. 배지의 탄소원으로는 일반적으로 알려진 바와 같이 비발효성 탄소원인 글리세롤이 균체형성 및 스팅고리피드 생성에 효과적이었으며, 통기조건은 스팅고리피드 생성에 절대적인 영향을 미치는 것이 확인되었다. 또한 배양온도는 25°C가 더 적합한 것으로 나타났다.

이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

효모 사카로마이세스세레비시예의 스팅고리피드 대사과정이 Ca<sup>++</sup>에 의해 조절받는 것이 밝혀졌으며, Ca<sup>++</sup>을 첨가했을 때 세린-팔미토일트랜스퍼라제(SPT) 활성이 약 2배 증가하는 것으로 보고되었다(Dunn). 배지조성중에 CaCl<sub>2</sub>를 2배 정도 증가하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 놀랍게도 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)은 오히려 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하면 스팅고리피드 생산이 현저히 감소하는 것이 관찰되었다.

스�팅고리피드 생합성은 세린과 팔미토일-CoA의 중합으로 시작된다. 이미 알려진 바와 같이 세린만을 배지에 첨가하였을 때 최소 2배 이상 스팅고리피드 생산이 증가함이 확인 되었으며, 첨가된 세린의 농도는 5g/L가 최적이었다. 그러나 팔미토일-CoA의 첨가는 영향이 없는 것으로 알려졌다. 이는 스팅고리피드의 생합성에서 세린의 세포내의 농도가 제한요인(limiting factor)이었다는 것을 암시한다. 위에서 보인 바와 같이 Ca

$Ca^{++}$ 의 첨가로 스프링고리피드 생합성과정이 활성화되면, 좀더 구체적으로 세린-팔미토일트랜스퍼라제의 활성이 증가된다면 최초 반응의 기질인 세린 또는 팔미토일-CoA의 세포내 농도가 제한요인이 될 것이다.  $Ca^{++}$ 과 세린을 각기 10mM, 5g/L씩 배지에 첨가한 회분식 발효에서 스프링고리피드의 생산은 아무것도 첨가하지 않았을 때보다 4~5배 증가하였으며, 이때 생성되는 TAPS의 배양액상의 농도는 통상 1.0g/L, 최대 1.5g/L에 이르렀다. 이 조건에서의 건조 균체량은 평균 12g/L로서 단위 균체량당 TAPS 생산량은 0.083~0.125g/gdw이었다.

발효 후 스프링고리피드의 분리정제는 일반적인 지질정제 방법인 유기용매 추출법이 사용되었다. 발효가 종료된 후 균체 및 배양액은 저장용기로 옮겨져 4°C에서 2일간 정치시켰다. 이 기간동안에 TAPS의 생성이 증가되는 것으로 보고 되었다. 4°C에 정치시켜 숙성되는 동안 가라앉은 균체를 손쉽게 상등액과 분리하여 회수한 후 유기용매로 추출하였다. 이 방법은 원심분리 또는 막분리에 의한 균체회수 과정을 생략할 수 있다는 점에서 효모 발효에 의한 스프링고리피드 생산의 경제성을 제고시키는 주요 요인이 될 것이다. 유기용매로 1차 추출된 전지질성분은 감압증류 방법으로 고형화시킨 후 소량의 적절한 유기용매에 녹여 실리카겔 칼럼크로마토그래피로 최종 TAPS를 정제하였다. 정제순도는 HPLC 분석으로 통상 95% 이상으로 확인되었다.

이와같이 얻어진 TAPS는 KOH 또는 NaOH 알코올용액과 같은 염기성용액에서 디아세틸반응을 통해 스프링고신 또는 파이토스프링고신으로 전환된다.

세라마이드 혹은 세라마이드 유도체들은 이와같이 얻어진 스프링고신 또는 파이토스프링고신을 지방산과 N-아실화반응시켜 얻을 수 있다. 이때의 지방산은 탄소수 6~40, 이중결합 0~3의 포화지방산 또는 불포화지방산에 모두 적용되며 특히 탄소수 6~20, 이중결합수 0~2의 포화 또는 불포화지방산에 더욱 잘 적용된다.

스프링고리피드 또는 그 염과 지방산과의 결합반응은 효소반응이나 화학반응에 의해 이루어진다. 화학반응에 사용되는 주요한 결합시약은 카르보디이미드, 카르보닐디이미다졸, 1,2-디히드로퀴놀론, 히드록시벤조트리아졸을 사용하거나 활성화된 지방산, 예를들어 할로겐화된 지방산을 사용하였다.

다음 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

#### [실시예 1]

##### Ca<sup>++</sup> 이온 효과 측정

YMgl(효모추출물 0.3%, 맥아추출물 0.3%, 펩톤 0.5%, 글리세롤 3%) 100ml를 250ml의 삼각플라스크(baffled)에 넣고 고압살균한 후 따로 멸균된 1M CaCl<sub>2</sub> 용액을 10mM이 되도록 첨가하였다. 전배양된 피키아 시페라이 DSCC 7-25와 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)를 동일량 접종하여 30°C, 250rpm으로 진탕배양하였다. DSCC 7-25는 배양 3일째, F-60-10은 배양 7일째에 배양을 종료하고 균체량 측정 및 스프링고리피드 추출과 분석을 하였다.

표 1에서 보는 바와 같이 본 발명의 균주 DSCC 7-25의 경우에는 CaCl<sub>2</sub> 첨가시 TAPS 생성이 1.9배 증가하였으나 F-60-10의 경우는 예상치 않게 오히려 5.6배나 감소하였다.

[표 1]

DSCC 7-25와 F-60-10의 TAPS 생성량에 대한 CaCl<sub>2</sub>

Strain	TAPS 생성량 (mg/L)		증감효과
	w/o CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> (10mM)	
DSCC 7-25	396	744	+ 1.9
F-60-10	241	43	- 5.6

#### [실시예 2]

##### Ca<sup>++</sup> 이온과 세린 첨가에 따른 TAPS 생산량의 증가효과

YMgl 액체배지 100mM에 CaCl<sub>2</sub> 10mM, 세린 5g/L, 또는 CaCl<sub>2</sub> 10mM, 세린 5g/L를 함께 넣고 전배양된 DSCC 7-25를 동량씩 접종하여 배양한 후 TAPS 생산량을 HPLC로 분석하였다. CaCl<sub>2</sub>와 세린을 각기 10mM, 5g/L씩 배지에 첨가한 회분식 발효에서 스프링고리피드의 생산은 아무것도 첨가하지 않았을 때보다 4~5배 증가하였으며, 이때 생성되는 TAPS의 배양액상의 농도는 통상 1.0g/L, 최대 1.5g/L에 이르렀다. 이 조건에서의 건조 균체량은 평균 12g/L로서 단위 균체량당 TAPS 생산량은 0.083~0.125g/gdw이었다. 표 2는 CaCl<sub>2</sub> 첨가에 따른 TAPS의 생산 수율을 나타낸 표이다.

[표 2]

## TAPS 생산 수율

Medium YMgl +	TAPS 생산수율		
	mg/L	mg/gdw	mg/L/H
None	284	22.3	3.94
* CaCl <sub>2</sub>	816	58.3	11.33
**Serine	784	54.8	10.88
CaCl <sub>2</sub> + Serine	1,065	88.2	14.79

\* CaCl<sub>2</sub> 10mM,      \*\* Serine 5 g/L

[실시예 3]

숙성탱크(Aging Tank)를 사용한 균체회수 및 분리정제 과정 간편화

500L 발효조에서 250L의 YMgl 배지를 사용하여 발효가 완료된 후 발효액은 특별히 고안된 저온저장이 가능한 숙성탱크로 옮겨서 4~10°C에서 2일간 저장을 하였다. 저장중에 갈아엀은 균체는 상등액을 숙성탱크 측면의 드레인밸브로 제거하여 회수할 수 있었다. 남아있는 균체 슬러리는 60L로서 최소 4배의 농축 효과가 있어 사용되는 지질수축 용매사용량을 최소화할 수 있었다. 동일한 숙성 탱크에서 남아있는 균체 슬러리에 적절한 용매를 잘 섞은 후 분리된 용매층은 탱크 하단의 드레인밸브를 통해 회수하여 감압증류로 농축하였다.

[실시예 4]

TAPS로부터 세라마이드의 합성

1.0g의 TAPS를 0.8g KOH/20 mL MeOH-물(9:1,v/v)에 넣고 4시간 동안 환류교반하였다. 상온에서 5 mL의 물을 가하고 5°C로 냉각한 후 생성된 침전물을 여과하여 회수하였다. MeOH-물(9:1,v/v) 혼합용매로 세척한 후 진공건조하여 옅은 노란색의 파이토스핑고신 고체 0.6g을 얻었다.

파이토스핑고신 2g과 올레인산 2g을 30 mL의 벤젠용매에 가하고 교반한다. D-톨루엔 술페릭산(Cat. amt)와 4 Å 분자체 2g을 반응용액에 가하고 질소환경하에 10시간 동안 환류 교반한다. 분자체를 여과하여 제거한 후 유기용매를 감압하에 날려보낸다. 잔여물에 MeOH-물을 가하여 생성된 흰색 침전을 모아 진공건조하여 1g의 N-올레일-파이토스핑고신을 얻었다.

## 발명의 효과

본 발명의 신규주 피키아 시페라이 DSCC 7-25(KFCC-10937호)를 최적 조건하에서 발효 배양시켜 고효율로 TAPS를 생성할 수 있었고, 생성된 TAPS를 공지의 방법으로 합성하여 각종 세라마이드 유도체를 더욱 경제적으로 제조할 수 있었다.

## (57) 청구의 범위

## 청구항 1.

YMgl 배지에 5~15mM의 CaCl<sub>2</sub> 및 세린 4~7g/L를 첨가한 배지에 피키아 시페라이 DSCC 7-25(KFCC-10937)를 접종 발효시켜 교반속도 400~600rpm에서 22~28°C에서 발효 배양하고 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 최대 배양액상 농도가 5~7g/L 되도록 회분식 배양함을 특징으로 하는 고효율 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 제조방법.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, YMgl 배지의 조성은 효모 추출물 0.2~0.4%, 액아추출물 0.2~0.4%, 펩톤 0.3~0.7%, 글리세롤 2.5~3.5%

수용액 배지임을 특징으로 하는 고효율 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 제조방법.

### 청구항 3.

제1항에 있어서, 배양된 균체 및 발효 생성물인 스팅고리피드를 3~6°C에서 2~3일간 정치시켜 침전된 균체를 분리 회수한 후, 유기용매로 추출하고 추출된 지질성분을 감압 증류 고형화시킨후, 유기용매에 녹여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 TAPS를 정제함을 특징으로 하는 고효율 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 제조방법.